

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

FAMILIENUNTERSUCHUNGEN ZUR
PRÜFUNG EINER KORRELATION DER
SERUMCHOLINESTERASE-RESTAKTIVITÄT
NACH VERGIFTUNG MIT DFP BZW.
ECHOTHIOPAT

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Andreas Ahnert
aus Regensburg

1981

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

FAMILIENUNTERSUCHUNGEN ZUR
PRÜFUNG EINER KORRELATION DER
SERUMCHOLINESTERASE-RESTAKTIVITÄT
NACH VERGIFTUNG MIT DFP BZW.
ECHOTHIOPAT

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Andreas Ahnert
aus Regensburg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr.Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.1981

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A EINLEITUNG	5
I. Allgemeiner Überblick über die Organ- phosphatverbindungen	5
II. DFP	7
1. Physikalische und chemische Eigen- schaften des DFP	7
2. Metabolismus und Verteilung von DFP im Säugetierorganismus	8
3. Pharmakologische Wirkungen des DFP	10
4. Anwendung von DFP als Medikament bei Myasthenia gravis und Glaukom	12
5. DFPase	12
III. Echothiopat	14
1. Chemische und physikalische Eigen- schaften von Echothiopat	14
2. Metabolismus und Verteilung im Organismus	15
3. Pharmakologische Wirkungen von Echothiopat	16
4. Medikamentöse Nutzung von Echothiopat	18
B PROBLEMSTELLUNG	20



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546212_0038

	Seite
C EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN	22
1. Art und Gewinnung des Untersuchungsmaterials	22
2. Verwendete Versuchsapparatur	22
3. Herstellung der verwendeten Puffer-, Alkylphosphat- und Butyrylcholinjodidlösungen	23
4. Versuchsablauf	25
5. Berechnung der Ausgangs- und der Restaktivität	27
6. Ergebnisse bei 14 untersuchten Familien mit insgesamt 53 Personen	29
7. Auswertung	35
D DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG	51
E LITERATURVERZEICHNIS	55

A EINLEITUNG

I Allgemeiner Überblick über die Organphosphat- verbindungen

Einzelne organische Phosphorsäureester sind schon seit über einhundert Jahren bekannt. 1854 synthetisierte De Clemont die erste Verbindung dieser Art, das Tetra-äthylpyrophosphat (TEPP).

G. Schrader untersuchte die Alkylphosphate seit 1934 systematisch und stellte schließlich 1944 E 605 (Parathion, O,O-Diäthyl-O(p-nitrophenyl)-thio-phosphat) (Abb. 1), den auch heute noch wichtigsten Vertreter der Phosphorsäureester, her.

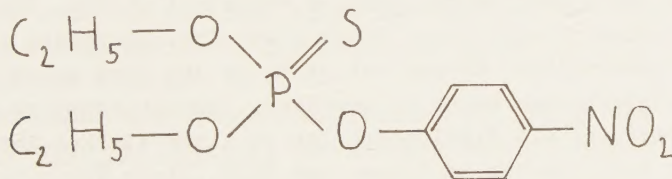


Abb. 1 : Strukturformel des Parathion

Die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen DFP und Echothiopat wurden wenige Jahre später synthetisiert. Im Jahre 1946 stießen Leopold und Comroe auf das DFP und elf Jahre später stellten Leopold und Gold erstmals Echothiopat her.

Alkylphosphate dienen als Weichmacher für Kunststoffe und als Oxidationsinhibitoren für Schmiermittel. Die wichtigste Verwendungsmöglichkeit dieser Verbindungen ergibt sich aber auf Grund ihrer biologischen Wirksamkeit. Alkylphosphate zeigen eine ausgeprägte insektizide Wirkung und nehmen deshalb in der Schädlingsbekämpfung eine führende Rolle ein.

Auf den Warmblüterorganismus haben die Alkylphosphate selbst in geringer Dosis eine hohe toxische Wirkung. Die Phosphorsäureester gehören zu den sogenannten irreversiblen Cholinesterasehemmern. Den Wirkungsmechanismus dieser Stoffgruppe klärte Grob (1947 b) auf.

Im Gegensatz zu den reversiblen Cholinesterasehemmern Physostigmin und Neostigmin können die Alkylphosphate nicht mehr oder nur relativ schwer durch eine Erhöhung der AcetylcholinKonzentration verdrängt werden. Sie gehen eine relativ feste Bindung mit Cholinesterase ein. Der menschliche Körper ist nicht in der Lage seine Cholinesterase rasch zu ersetzen. Deshalb kommt es bei Vergiftung mit Alkylphosphaten zu einem starken Anstieg von Acetylcholin im Gewebe und Blut. Diese Überschwemmung des Körpers mit Acetylcholin führt zu einer Dauerdepolarisation erregbarer Membranen und damit zur Unterbrechung cholinergischer Erregungsüberleitungen. Ohne sofortige Therapie hat dies die Lähmung der Atemmuskulatur, einen Herzstillstand und somit den Tod des Organismus zur Folge.

Parathion wird im menschlichen Körper durch Austausch eines Schwefelatoms in das eigentlich wirksame Paraoxon (E 600) umgewandelt. Lange Zeit glaubte

man, daß der menschliche Körper E 600 nicht spalten könnte.

Aldrige (1953) entdeckte als erster zwei verschiedene Serumesterasen A und B, die durch Paraoxon unterschiedlich hemmbar waren. Kurz darauf fand wiederum Aldrige (1953) in Seren von Kaninchen, Ratten und Pferden ein E 600 spaltendes Enzym (Paraoxonase), das der Esterase A entsprach.

Krisch (1968) konnte nachweisen, daß auch das menschliche Serum Paraoxon zu spalten vermag. Weiter fand er zwei Personengruppen, die eine unterschiedliche Paraoxonaseaktivität aufwiesen.

Geldmacher-v. Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) stellten schließlich einen Polymorphismus bei der Vergiftung der menschlichen Serumcholinesterase durch Inkubation mit Paraoxon fest.

Die voneinander abweichenden Ergebnisse bei Krisch und Geldmacher-v. Mallinckrodt waren wahrscheinlich eine Folge der unterschiedlichen Methodenwahl und der unterschiedlichen Wahl der Giftkonzentrationen.

II DFP

1) Physikalische und chemische Eigenschaften des DFP

DFP ist die Abkürzung für die chemische Verbindung Diisopropylfluorophosphat (Abb. 2). DFP ist eine

synthetische Verbindung. Es zeigt einen Schmelzpunkt unter 50°C , der Siedepunkt liegt bei 183°C Celsius. Das Gift liegt also unter Normalbedingungen in flüssigem Zustand vor. Die Dichte beträgt 1,07, die Sättigungskonzentration in Luft bei 20°C Celsius liegt bei 9,7 mg/l. In wässriger Lösung erweist sich DFP als wenig stabil (Ell W., 1979).

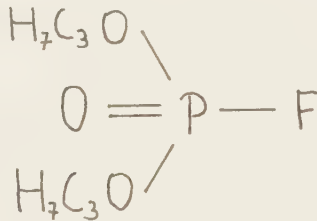


Abb. 2 : Strukturformel des DFP

2) Metabolismus und Verteilung von DFP im Säugetierorganismus

Im lebenden Organismus bestehen für das DFP drei Reaktionsmöglichkeiten:

- 1) Die spontane Hydrolyse, mit Bildung von Fluorwasserstoff und Diisopropylphosphat (DIP).
- 2) Die enzymatische Hydrolyse mit Hilfe einer DFPase unter Bildung der gleichen, bei Punkt 1 genannten, Spaltprodukte.
- 3) Die Bindung an ein Strukturprotein bzw. ein Enzym, wobei häufig ein Serinrest im aktiven Zentrum des

Enzyms den Reaktionspartner des DFP darstellt
(Oosterbaan 1958, Wählby 1966, 1968).

Da das DFP eine hohe Affinität zu meist proteolytischen Enzymen aufweist, kommt es im lebenden Organismus vor allem zur Bindung an Proteine. Nicht proteingebundenes DFP wird schnell durch die DFPase gespalten. Die spontane Hydrolyse spielt im Organismus kaum eine Rolle (Latki 1961).

Cohen und Warringa (1954) konnten mit Hilfe von radioaktiv markiertem DFP³² nach intramuskulärer Injektion von 0,24 mg bis 1,99 mg DFP zeigen, daß der Blutspiegel bei Menschen 90 Minuten nach der Injektion ein Maximum aufweist. Bis zu einem Monat ließ sich weiterhin radioaktiv markierter Phosphor, ausschließlich in Form von DIP³², an Plasmaproteine und zelluläre Bestandteile des Blutes gebunden, nachweisen. Die Ausscheidung des markierten P³² erfolgte zum größten Teil mit dem Urin, nur ein geringer Anteil wurde über die Galle mit dem Stuhl ausgeschieden.

Je länger das Zeitintervall zwischen der Gabe von DFP und der Gewebsanalyse gewählt wird, desto mehr liegt DFP in proteingebundener Form in den einzelnen Organen vor. Zunächst kommt es zu einer Anlagerung des DFP im interstitiellen Gewebe an die Zellmembranen, schließlich aber tritt DFP in das Zellinnere ein.

DFP wird nach intravenöser Gabe von allen Geweben aufgenommen. Die Leber dient als Speicherorgan und enthält im weiteren Verlauf das meiste proteingebundene DIP³² (Hansen 1968).

3) Pharmakologische Wirkungen des DFP

Die meisten klinischen Symptome, die bei einer Vergiftung mit DFP auftreten, können durch die Hemmung der Acetylcholinesterase erklärt werden. Bei einer starken Dosiserhöhung, die vom Warmblüterorganismus nur unter zusätzlicher Gabe von Toxogonin^R und Atropin ertragen wird, zeigen sich jedoch Erscheinungen, die auf nicotin- bzw. muskarinartige Eigenwirkungen zurückzuführen sind.

Verbeke (1948, 1949) machte dies bei seinen Versuchen am Hundeherzen deutlich. Bei sehr geringer DFP-Dosis zeigte das Herz lediglich eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Acetylcholin. Wurde die Dosis auf 30 mg DFP /kg gesteigert, kam es auf Grund der nikotinartigen Wirkung des DFP zu einer Stimulation des nervus vagus und damit zur Bradykardie. Eine weitere Erhöhung der Dosis führte zur Blockade des nervus vagus und es trat eine Tachykardie auf.

Ähnlich hohe Dosen, wie sie zur Blockierung des nervus vagus nötig sind, führen durch die enzymatische Spaltung des DFP unter Bildung von Fluoridionen zur Ansäuerung des Gewebes. Infolge einer solchen pH-Verschiebung kann es zu einer Reizleitungsunterbrechung kommen (Hoskin 1971).

Neben den oben beschriebenen Herzsymptomen kommt es im Bereich des Respirationstrakts nach hohen DFP-Gaben aufgrund einer Depression des Atemzentrums zur Hypo- bzw. Apnoe. Außerdem tritt infolge der nikotinartigen Eigenwirkung des DFP ein Bronchospasmus mit verstärkter

Schleimsekretion auf.

Von Seiten des ZNS zeigen sich bei akuter Intoxikation mit DFP motorische Unruhe, Spastik und Krampfanfälle (Verbeke 1949).

Die Aufnahme von DFP führt an den glatten und quergestreiften Muskeln zu einer verstärkten Ansprechbarkeit auf Acetylcholin. Nach längerdauernder Aufnahme kommt es zu einer ausgeprägten Muskelschwäche, die in eine vollständige Paralyse übergehen kann (Koelle 1946).

Da DFP auch als Therapeutikum in verschiedenen medizinischen Bereichen eingeführt wurde, waren vor allem die unerwünschten Nebenwirkungen bei chronischer Aufnahme von 6 - 8 mg DFP per os von Interesse.

Comroe (1946) und Grob (1947 a, b) konnten nachweisen, daß in diesen Fällen die Symptome von Seiten des Zentralnervensystems, wie Schlaflosigkeit, Unruhe, Kopfschmerzen, Parästhesien, Paresen und Halluzinationen im Vordergrund standen. Erst bei Dosissteigerung traten die bereits oben beschriebenen Symptome von Seiten des Gastrointestinal- und Respirationstrakts auf.

All diese Symptome verschwanden nach Absetzen des DFP innerhalb weniger Tage. Veränderungen im EEG, die bei allen untersuchten Personen festgestellt wurden, konnten aber noch wochenlang nach Beendigung der Einnahme von DFP nachgewiesen werden.

4) Anwendung von DFP als Medikament bei Myasthenia gravis und Glaukom

Nach intramuskulärer Gabe von DFP kommt es bei entsprechender Dosierung zu einem Anstieg der groben Muskelkraft. Der therapeutische Effekt bleibt über eine Woche erhalten, ist also dem therapeutischen Effekt von Neostigmin überlegen. Dieser Vorteil muß aber zugleich mit erheblichen Nebenwirkungen von Seiten des Zentralnervensystems und des Gastrointestinaltraktes erkauft werden.

Zur Behandlung des Glaukoms wird eine 0,1 %-ige ölige Lösung in den Konjunktivalsack geträufelt. Dies führt zu einer Senkung des Augeninnendrucks, auch in den Fällen, wo Pilocarpin und Physostigmin versagen. Bei dieser Anwendungsweise sind ebenfalls Nebenwirkungen, wie Augenschmerzen, Iritiden, Linsentrübungen und Epitheloidzysten im Bereich der Iris zu erwarten (Leopold und Comroe 1946 a, b).

Wegen dieser ausgeprägten Nebenwirkungen werden die Präparate Fluostigmin^R, Diflupil^R und Floropryl^R, in denen DFP enthalten ist, außer bei therapieresistentem Glaukom als Mittel 2. Wahl, heute kaum noch eingesetzt.

5) DFPase

Es sind bereits zahlreiche Arbeiten veröffentlicht worden, die sich mit der Frage nach der Existenz von

spezifischen Enzymen für die Hydrolyse von Diisopropylfluorophosphat beschäftigt haben.

Mazur und Bodanski (1946) stellten bei ihren Versuchen mit Hilfe der Warburg - Apparatur fest, daß sich sowohl im Plasma als auch im Gewebe von Kaninchen und Menschen ein DFP- hydrolysierendes Enzym befindet. Als Spaltprodukte einer DFP- Hydrolyse konnten sie H^+ -Ionen und F^- -Ionen nachweisen. Das DFP - spaltende Enzym zeigte keine Identität mit einer der bisher bekannten Cholinesterasen oder Phosphatasen.

Dies ist bisher die einzige Arbeit, in der das Vorkommen von DFPase im Serum des Menschen mit DFP als Substrat geprüft wurde.

Augustinsson und Heimbürger (1954) fanden bei sieben verschiedenen Tierarten sowie beim Menschen ein organische Phosphorverbindungen hydrolysierendes Ferment, das sie Tabunase nannten. Als sich aber während ihrer Untersuchungen herausstellte, daß es nicht nur Tabun, sondern auch auf andere Alkylphosphate, wie zum Beispiel Diisopropylfluorophosphat und Paraoxon, hydrolysierend wirkte, nannten sie das Enzym allgemein Phosphorylphosphatase.

Mounter (1954) untersuchte die Hydrolyse von DFP, TEPP (Tetraaethylpyrophosphat), Paraoxon und p-Nitrophenylacetat in Kaninchenherzen. Die gleiche Hitzeempfindlichkeit der enzymatischen Hydrolyse bei allen vier Substraten, die fast identische Blockierbarkeit ihrer Hydrolyse durch Schwermetallionen und die kompetitive Hemmung bei Substratgemischen ließen ihn

zu dem Schluß kommen, daß ein einziges Enzym für die Hydrolyse der vier Substrate verantwortlich sein müsse.

Neurath (1965) entdeckte, daß in Sendai- und New Castle Disease (NCD)- Viruspräparationen ein Enzym enthalten war, das die DFP- Hydrolyse enzymatisch beschleunigen konnte. Es zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen hämolytischer und DFP- spaltender Aktivität. Neurath nahm deshalb an, daß für das Sendai- und das NCD- Virus Hämolysin und DFPase identisch seien.

III Echothiopat

1) Chemische und physikalische Eigenschaften von Echothiopat

Bei Echothiopat-Jodid (2- (0,0-Diäthyl-phosphono-thio)-äthyl -trimethyl ammonium-jodid) (Abb. 3), handelt es sich, ebenso wie beim DFP, um einen nahezu irreversiblen Cholinesterasehemmer. Seine chemische Struktur läßt sich teils von Phosphorsäureestern, teils von Acetylcholin herleiten.

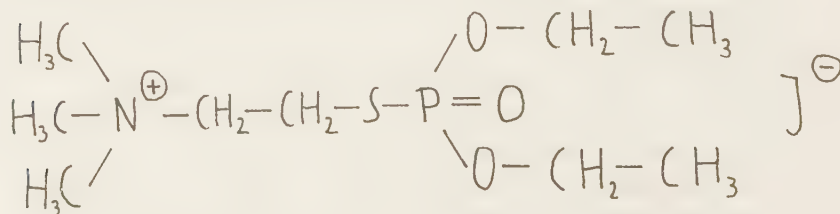


Abb. 3 : Strukturformel von Echothiopat - Jodid
(Phospholine Jodide ^R) Leopold und Gold (1957)

Die Darstellung erfolgt durch Umsetzung von Dimethylaminoäthylmercaptan mit Phosphorsäurediäthylesterchlorid und anschließender Quaternierung. Echothiopat ist als weißes, kristallines Pulver erhältlich. Die Substanz ist gut wasserlöslich und zeigt eine geringe Fettlöslichkeit. Die Trockensubstanz ist viele Monate stabil, muß aber in dicht schließenden Behältern aufbewahrt werden, da sie stark hygroskopisch ist.

2) Metabolismus und Verteilung im Organismus

Echothiopat wird durch die Magendarmschleimhaut, die Konjunktiven und durch die Schleimhaut des Nasopharynx resorbiert. Auf Grund seines quaternären Stickstoffatoms kann Echothiopat die Bluthirnschranke schlecht, die Plazentaschranke aber gut durchdringen (Koelle, Steiner 1956).

Durch seine nahezu irreversible Verbindung mit Cholinesterase ist der Verbleib von Echothiopat im menschlichen Körper vor allem von der Abbaugeschwindigkeit des blockierten Enzyms abhängig.

Haddat und Leopold (1969) konnten mit tritiummarkiertem Phospholine- Jodide durch in-vivo- Tests am Hasenauge und durch in-vitro- Tests am Linsengewebe die Akkumulation im Augengewebe, speziell im Kammerwasser und in der Linse, nachweisen.

Hussain et al. (1968) beschäftigten sich mit dem Abbaumechanismus von Echothiopat in wässrigen Lösungen.

Dabei zeigte sich, daß die Abbaugeschwindigkeit von Echothiopat innerhalb eines weiten pH- Bereichs einer Reaktion erster Ordnung entspricht.

Im alkalischen Bereich über pH 9 kam es zur hydrolytischen Spaltung der Schwefel- Phosphor- Bindung. Im sauren Milieu unter pH 5 erfolgt eine hydrolytische Spaltung der C- O Bindung zu Aethanol und Trimethyl- (2- Hydroxyläthyl) ammoniumiodid.

4) Pharmakologische Wirkungen von Echothiopat

Nach Aufnahme von Echothiopat kommt es in den Erythrozyten, im Blutplasma und in den einzelnen Organen, mit Ausnahme des Zentralnervensystems, zum Absinken der Cholinesteraseaktivität.

De Roeth (1966) konnte bei Gabe einer 0,06 %-igen Echothiopat - Lösung eine 35 bis 40 %-ige Hemmung der Aktivität der Erythrozyten - und Plasmacholinesterase bei Glaukomapatienten nachweisen. Bei Anwendung einer 0,25 %-igen Echothiopat - Lösung kam es zu einer 80 %-igen Enzymhemmung. Diese Hemmung wurde nach 30 - tägiger Gabe erreicht und blieb dann ein Jahr lang nahezu konstant.

Marynen de Preter (1972) untersuchte nach Gabe von 0,125 %-igen und 0,06 %-igen Phospholine - Jodide - Lösungen die Pseudocholinesteraseaktivitäten von zehn Kindern. Es zeigte sich, daß der Abfall der Pseudocholinesteraseaktivität sehr rasch erfolgt. Je häufiger das Medikament angewandt wurde und je höher die Konzen-

tration war, desto stärker war die Hemmung der Pseudocholinesterase. Nach Absetzen von Phospholine-Jodide erreichte die Pseudocholinesteraseaktivität innerhalb von 30 Tagen wieder Normalwerte.

Ellis überprüfte bereits 1967 die Wirkung von Phospholine - Jodide auf die Cholinesteraseaktivität von Kindern bei örtlicher Anwendung am Auge.

In jedem Fall nahm die Cholinesteraseaktivität im Blut ab. Es zeigten sich aber große individuelle Unterschiede, die Aktivitätsverluste betrugen zwischen 15 % und 77 %, gemessen am Ausgangswert. Die meisten Patienten blieben bei Blutcholinesterasewerten von 20 % des Normalwertes symptomlos, einige tolerierten sogar Aktivitätsabnahmen bis zu 5 % des Normalwerts.

Ellis kam wie Leopold und De Roeth (1966) zu dem Schluß, daß keine enge Beziehung zwischen der Höhe der Blutcholinesteraseaktivität und systemisch-toxischen Reaktionen zu finden ist. Sie sahen vielmehr einen Zusammenhang zwischen der Hemmung der Cholinesterase im Gewebe und den toxischen Nebenwirkungen.

Die klinischen Erscheinungen bei einer Überdosierung erklären sich hauptsächlich aus der oben beschriebenen Cholinesterasehemmung und der damit verbundenen Überschwemmung des Organismus mit Acetylcholin.

So kann es, ähnlich wie bei einer DFP - Intoxikation, zu Krämpfen des Magen- und Darmkanals, zu Durchfällen und zu Erbrechen kommen. Die einzelnen Körperdrüsen werden zu verstärkter Sekretion angeregt. Der Blutdruck sinkt ab und es kommt zu einer ausgeprägten

Bradykardie. An den quergestreiften Muskeln zeigen sich Paresen und ein starker Tremor, bei hochgradigen Vergiftungen entwickelt sich eine nahezu vollständige Paralyse. Als hauptsächliche ZNS - Wirkungen zeigen sich Ataxie, Konvulsionen, Koma und Depressionen der Atmungs- und Kreislaufzentren (Hiscox, Mc Culloch, 1965).

4) Medikamentöse Nutzung von Echothiopat

Phospholine - Jodide ^R (Echothiopat) wird hauptsächlich in der Augenheilkunde, speziell zur Behandlung der verschiedenen Glaukomerkrankungen, angewandt.

Bei Gabe von Phospholine - Jodide ^R kommt es durch eine hervorgerufene Miosis und durch einen Spasmus des Ziliarmuskels zu einer Verminderung des Abflußwiderstandes des Kammerwassers, auch häufig in den Fällen, in denen eine andere medikamentöse Therapie nicht mehr angesprochen hat. Echothiopat hat eine lang anhaltende Wirkung und wird deshalb nur ein- bis zweimal am Tag in Tropfenform am Auge angewandt (Becker, Pyle und Drews, 1959).

Als Nebenwirkungen bei einer Therapie mit Phospholine-Jodide ^R treten Iriszysten, vordere Synechien und bei längerer Anwendung Linsentrübungen bei nahezu 50 % der Patienten auf (Axelsson und Holmberg, 1966).

In Deutschland wird Echothiopatjodid von der Chemisch-pharmazeutischen Fabrik Dr. Winzer, Konstanz, in

Lizenz der Ayerst Benelux S. A., Brüssel, unter dem Namen Phospholiniodid ^R in einer 0,125 %-igen Lösung angeboten.

B PROBLEMSTELLUNG

Über die Verteilung und Genetik der Serum - Para-oxonase liegen bereits zahlreiche Arbeiten vor. Geldmacher- v. Mallinckrodt et al. (1969, 1973) fanden drei Gruppen verschiedener Restaktivitäten der Serumcholinesterase nach Inkubation menschlicher Seren mit Paraoxon. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte weiter gezeigt werden, daß dieser Polymorphismus genetisch determiniert ist, in seiner Vererbung einem einfachen 2 - Allel - Modell folgt und somit ein intermediäres Vererbungsmodell wahrscheinlich wird (Geldmacher- v. Mallinckrodt et al. 1979).

Nach Greiner zeigte sich im Gegensatz zum Paraoxon bei Inkubation von menschlichem Serum mit DFP keine trimodale, sondern eine unimodale Verteilung.

Auf Grund der gerade beschriebenen Untersuchungen von Geldmacher- v. Mallinckrodt et al. (1979) konnten unterschiedliche Aktivitäten für das Enzym nachgewiesen werden, welches Paraoxon spaltet. Die Vermutung liegt nahe, daß nicht nur für dieses Alkylphosphat ein spezifisches abbauendes Enzym im Warmblüterorganismus zu finden ist, sondern daß auch für andere Phosphorsäureester entsprechende abbauende Enzyme im Serum vorliegen.

Ziel dieser Arbeit soll es nun sein, ein weiteres Alkylphosphat, nämlich Echothiopat, auf seinen möglichen Abbau im menschlichen Serum hin zu untersuchen, die Verteilungsprobleme zu klären und damit eventuell eine Enzymabgrenzung zur Paraoxonase und zur DFPase

vornehmen zu können.

Mit Hilfe dieser Familienuntersuchung soll weiter geklärt werden, ob eine genetische Abhängigkeit und ein spezifischer Vererbungsmodus einer Serum-Echothiopatase besteht, wobei ein Vergleich mit DFP erfolgte.

Geeignet erschien die Anticholinesterase - Technik in der Warburg - Apparatur, in Anlehnung an die von E. Häusler entwickelte Untersuchungsmethode zur Bestimmung der Serumcholinesterase - Restaktivität nach Vergiftung mit Echothiopat, sowie der entsprechenden Arbeit von G. Greiner über DFP.

C EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

1) Art und Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Als Untersuchungsmaterial diente uns menschliches Serum. Um es zu gewinnen, wurde 53 Personen aus 14 Familien mit Serummonovetten der Firma Sarstedt 10 ml Venenblut entnommen. Dieses Blut wurde etwa 20 Minuten lang bei 1500 Umdrehungen/ min zentrifugiert, wobei sich bei vorsichtiger Handhabung keine Hämolyse zeigte. Eine Hämolyse hätte jedoch nicht zu falschen Ergebnissen geführt, da das von uns verwendete Substrat Butyrylcholinjodid nur mit Pseudocholinesterase, nicht aber mit Erythrozytencholinesterase reagiert.

Das so gewonnene Serum wurde unverzüglich nach der Zentrifugation verarbeitet bzw. bei $+4^{\circ}$ Celsius im Kühlschrank aufbewahrt. Der Zeitabschnitt zwischen der Entnahme und Verarbeitung des gekühlten Serums betrug in keinem Fall mehr als 3 Tage. Konnte aus technischen Gründen das Serum in dieser Zeit nicht verarbeitet werden, so froren wir es bei -20° Celsius in einer Tiefkühltruhe ein. Einen Aktivitätsverlust unseres zu untersuchenden Enzyms konnten wir unter diesen Bedingungen nicht feststellen.

2) Verwendete Versuchsanordnung

Die Serumcholinesteraseaktivität und deren Restaktivität nach Vergiftung des Serums wurden in einer Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, mit Hilfe der manometrischen Methode von Ammon (1934) in der

Modifikation von Friedberg und Sakai (1958), jedoch bei einem pH - Wert von 7,2, bestimmt.

3) Herstellung der verwendeten Puffer-, Alkylphosphat- und Butyrylcholinjodidlösungen

Pufferlösung:

Lösung 1: In 300 ml ultrareinem Wasser lösten wir
2,7 g NaCl

Lösung 2: In weiteren 100 ml ultrareinem Wasser
wurden 1,26 g NaHCO_3 gelöst

Anschliessend wurden von Lösung zwei 10 ml Salzlösung abpipetiert und verworfen. 300 ml der Lösung 1 und die restlichen 90 ml der Lösung 2 ergaben dann zusammen die benötigte Verdünnungslösung.

Diese Pufferlösung mußte spätestens alle 4 Tage erneuert werden, um Verunreinigungen der Flüssigkeit zu vermeiden.

Butyrylcholinjodidlösung:

Die BCJ - Lösung wurde durch Auflösung von 0,546 g Butyrylcholinjodid in 100 ml ultrareinem Wasser gewonnen. Diese Substratlösung mußte täglich neu hergestellt werden und wurde während des Tages an einem lichtgeschützten Ort aufbewahrt.

Butyrylcholinjodid (BCJ) wurde von uns dem Acetylcholin vorgezogen, da es einerseits wie bereits oben erwähnt das physiologische Substrat der Serumcholinesterase ist, mit Erythrozytencholinesterase keine Reaktion zeigte, und somit bei Hämolyse des Blutes nicht

zur Unbrauchbarkeit des gewonnenen Serums führte. Außerdem ergibt Butyrylcholinjodid eine etwa doppelt so starke CO_2 - Freisetzung pro Zeiteinheit wie Acethylcholin. Dies verkürzt den gesamten Meßvorgang auf die Hälfte der ursprünglichen Zeit.

Die tägliche Zubereitung der zur Vergiftung des Serums notwendigen Giftlösungen haben wir wie folgt durchgeführt:

Alkylphosphatlösungen:

Echothiopat- Lösung:

Lösung I : Echothiopat lag uns als Reinsubstanz des Jodid in Pulverform vor.

Zunächst lösten wir 50 mg Echothiopat in 50 ml ultrareinem Wasser. Diese Stammlösung lagerten wir bis zu 14 Tagen bei $+4^\circ$ Celsius im Kühlschrank. Nach Angaben der Herstellerfirma und nach Häusler war kein Aktivitätsverlust während dieser Zeit zu erwarten. Aus dieser Stammlösung wurde täglich 1 ml entnommen und in 35 ml ultrareinem Wasser gelöst. Sodann wurde 10 Minuten geschüttelt.

Lösung II : Aus Lösung I wurden 5 μl abpipettiert und in 40 ml Pufferlösung gegeben.

Mit Hilfe der Lösung II erfolgte die spätere Vergiftung des Serums. Auf Grund dieser Giftverdünnung lagen unsere Restaktivitätswerte bei Vergiftung des Serums mit Echothiopat in einem, für unsere Zwecke, günstigen Meßbereich von 16,0 % bis 38,9 %.

Diisopropyl-fluorophosphat (DFP) - Lösung:

1 μ l reines DFP wurde zunächst mit einer geeichten Mikropipette Marke Goldbrand zu 120 ml ultrareinem Wasser gegeben. Wiederum wurde 10 Minuten geschüttelt und dann aus dieser Lösung 5 μ l in 40 ml Pufferlösung abpipettiert.

Beide Giftlösungen wurden außerhalb des Versuchslabors unter dem Abzug hergestellt, um einerseits die vorzeitige Vergiftung unserer Versuchsseren zu verhindern und um andererseits den Hersteller der Giftlösungen vor Vergiftungen mit einem der beiden Alkylphosphate zu schützen. Dies war nötig, da vor allen Dingen das reine DFP einen hohen Dampfdruck zeigt, und die Herstellung der Giftlösung im Versuchslabor die weitgehende Vergiftung unserer Versuchsseren zur Folge hatte.

Eine 2 %-ige NaOH- Lösung zur Zerstörung der Alkylphosphate war während unserer Versuche immer griffbereit, um bei etwaigen Unfällen (z. B. Umschütten der Giftlösung) eine sofortige Inaktivierung der Alkylphosphate durchführen zu können.

4) Versuchsablauf

Je 0,15 ml Serum wurden im Reagenzglas mit 1,35 ml Verdünnungslösung bzw. 1,35 ml Giftlösung vermischt.

Damit ergab sich eine DFP- Konzentration im Reaktionsansatz von $c = 5,09 \cdot 10^{-9}$ M.

Die Echothiopat- Konzentration erreichte dabei einen Wert von $c = 8,3 \cdot 10^{-9}$ M.

Mit der Vergiftung der Seren im Reagenzglas begann die einstündige Inkubationszeit.

In die einzelnen Anhangsbirnen der Warburggefäße wurden sofort wegen der Temperaturkonstanz jeweils 0,5 ml des verdünnten (zur Messung der Normalaktivität) bzw. 0,5 ml des vergifteten Serums (zur Messung der Restaktivität), in jeden der Reaktionsräume des Warburgkölbchens 1,5 ml 0,546 %-ige Butyrylcholinjodidlösung einpipettiert. Die verwendeten Kölbchen sind in Abbildung 4 dargestellt. Für jede Versuchsperson füllen wir 2 Anhangsbirnen mit verdünntem Serum und 2 Anhangsbirnen mit vergiftetem Serum. Da an unserer Warburgapparatur 14 Gefäße mit den dazugehörenden Manometersäulen angebracht waren, konnten unter zusätzlicher Berücksichtigung zweier Leerwerte (1,5 ml Butyrylcholinjodidlösung im Reaktionsraum, 0,5 ml reine Verdünnungslösung in der Anhangsbirne) gleichzeitig drei Personen untersucht werden. Die beiden Leerwerte waren nötig, um die Eigenhydrolyse unseres Substrats Butyrylcholinjodid berücksichtigen zu können.

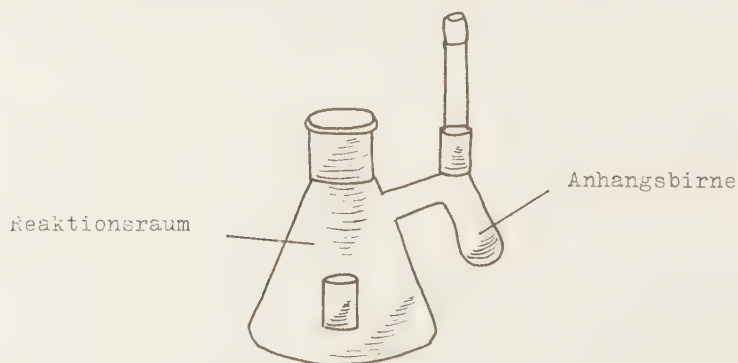


Abb. 4 : Schematische Darstellung eines Warburgkölbchens mit Reaktionsraum und Anhangsbirne

Nachdem wir alle Warburggefäße ordnungsgemäß mit den entsprechenden Flüssigkeiten gefüllt hatten, wurden sie an die Manometer angeschlossen. Dabei achteten wir besonders auf die exakte Abdichtung der einzelnen Manometerhähne. Nach der Befestigung der Manometersäulen und Gefäße an das Warburggerät und Eintauchen in ein Wasserbad von 37° Celsius wurde die Schüttelautomatik (Frequenz 100/min) eingeschaltet.

35 Minuten nach dem Beginn der Inkubationszeit begasten wir die Kölbchen 20 Minuten lang mit einem Gemisch aus 95 % N_2 und 5 % CO_2 unter weiterem Schütteln. 5 Minuten vor Ende der Inkubationszeit wurde die Gasung abgebrochen. Der pH- Wert lag nun bei etwa 7,7 (Süllmann 1964).

Nun wurde der Inhalt der Anhangsbirnen in die jeweiligen Reaktionsräume entleert und noch drei Minuten bis zum Ende der Inkubationszeit unverschlossen gerüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden von uns die Manometervordifferenzen abgelesen und das System geschlossen. Der pH- Wert lag nun bei 7,2 (Süllmann 1964). Nach weiteren 15 und 30 Minuten lasen wir den Manometerstand ab. Die Schüttelautomatik blieb dabei, mit Ausnahme der kurzen Zeit des Ablesevorgangs, eingeschaltet.

5) Berechnung der Ausgangs- und der Restaktivität

Von den nach 30 Minuten abgelesenen Manometerwerten zogen wir jeweils die entsprechenden Vordifferenzen ab.

Danach wurden diese Werte mit den entsprechenden Manometerkonstanten multipliziert. In gleicher Weise wurde der Leerwert ermittelt.

Die Berechnung der Manometerkonstanten erfolgte nach Süllmann (1964) folgendermaßen:

$$K = \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F a}{P_0}$$

wobei gilt:

V_G	=	Gasraumvolumen
T	=	Versuchstemperatur
V_F	=	Flüssigkeitsvolumen
a	=	Absorptionskoeffizient
P_0	=	Normaldruck

Da sowohl die Leerwerte, als auch die Ergebnisse des unvergifteten und des vergifteten Serums in einem Versuchsablauf in Doppelbestimmung ermittelt wurden, konnte von den so gewonnenen Werten jeweils das arithmetrische Mittel gebildet werden.

Nach dem jeweiligen Abzug des Leerwertes ergab sich die Ausgangsaktivität. Die Angabe erfolgte in $\mu\text{l CO}_2 / 30 \text{ min.}$

Das Verhältnis des ermittelten Wertes nach Vergiftung zu dem entsprechenden Wert ohne Vergiftung ergab nach Multiplikation mit 100 die Restaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität.

6) Ergebnisse bei 14 untersuchten Familien mit insgesamt 53 Personen

Mit Hilfe der oben beschriebenen Methodik wurden von uns 14 Familien mit insgesamt 53 Personen aus dem Raum Oberpfalz (Regensburg und Landkreis) untersucht.

Es handelte sich dabei um 28 männliche Personen im Alter von 8 bis 59 Jahren und um 23 weibliche Personen im Alter von 10 bis 55 Jahren.

In Tabelle 1 sind die einzelnen Personen mit ihrem Alter, ihrer Cholinesteraseausgangsaktivität in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$ bezogen auf 0,15 ml Serum, und ihrer Restaktivität in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$, sowie in Prozent der Ausgangsaktivität nach Vergiftung mit Echothiopat und DFP ausgeführt.

Tabelle 1: Cholinesteraseausgangsaktivität und -restaktivität nach Vergiftung mit Echothiopat und DFP bei 53 Personen aus 14 Familien

FAMILIE	ALTER	AUSGANGS- AKTIVITÄT absolut in μ l/30 min	Ech o t h i o p a t absolut in μ l/30 min	relativ in %	R E S T A K T I V I T Ä T absolut in μ l/30 min	relativ in %
1) <u>Bütterich</u>						
Franz	55	266,6	89,0	33,4	96,2	36,1
Karolina	53	251,5	84,6	33,7	88,5	35,2
Franz	27	253,8	98,7	28,9	76,1	30,0
2) <u>Breu</u>						
Karl	52	204,7	37,7	18,4	44,0	21,5
Luise	51	204,6	50,5	24,7	71,4	34,9
Karl	25	210,9	53,4	25,3	61,6	29,2
Thomas	18	139,4	28,0	20,1	31,8	22,8
3) <u>Häusler</u>						
Franz-Xaver	54	224,0	55,8	24,9	65,2	29,1
Irmgard	51	196,5	46,2	23,5	47,6	24,2
Elisabeth	23	175,9	35,4	20,1	36,2	20,6
Martin	21	192,4	40,2	20,9	31,6	16,4

FAMILIE	ALTER	AUSGANGS- AKTIVITÄT absolut in μ l/30 min	Ech o t h absolut in μ l/30 min	R E S T A K T i o p a t absolut in relativ in %	I V I T Ä T absolut in μ l/30 min	D F P absolut in relativ in %
---------	-------	--	---	---	---	--

4) Mittermeier

Karl	44	173,8	40,1	23,1	42,8	24,6
Waltraud	43	126,5	22,8	18,0	17,2	13,6
Angelika	23	162,1	29,7	18,3	28,2	17,4
Karl-Heinz	20	146,5	27,5	18,8	35,2	24,0

5) Spiegel

Karl	37	171,2	36,0	35,4	111,7	41,2
Anna	37	159,5	42,6	26,7	20,7	13,0
Rudi	18	238,2	71,7	30,1	83,8	35,2
Martin	8	184,8	41,4	22,4	39,5	21,4

6) Wolff

Alfons	53	189,4	53,2	28,1	39,9	21,1
Anna	52	203,5	51,9	24,9	46,5	22,3
Heinbert	27	111,1	17,7	21,7	21,4	37,7

FAMILIE	ALTER	ALZHEIMER- KPL. TIT. F absolut in μ l/30 min	„echo“ absolut in μ l/30 min	2 F 5 T A K T in %	relativ in %	I V I T K T F P absolut in μ l/30 min	relativ in %
7) Wunsch							
Franz	57	210,8	55,4	26,3		58,8	27,9
Berdi	53	200,1	38,4	19,2		44,2	22,1
Herbert	12	177,6	35,5	20,0		27,0	15,2
Ingrid	20	204,7	45,6	22,3		63,3	30,9
8) Niebler							
Richard	34	180,6	40,4	22,4		58,2	32,2
Marianne	31	175,6	28,1	16,0		23,7	13,5
Doris	10	130,8	29,3	22,4		14,7	11,2
Martina	13	126,6	26,2	20,7		20,8	16,4
9) Förtsch							
Andreas	57	212,1	51,9	24,5		49,4	23,3
Anna-Beate	55	164,3	26,5	16,1		29,7	18,1
Brigitte	23	271,0	84,6	31,2		110,8	40,9

7) Auswertung:

Als erstes prüften wir das Histogramm der Restaktivitätswerte nach Echothiopatvergiftung. Es ergibt für die nicht blutsverwandten Elternteile eine nahezu eingipfelige Verteilung (Abbildung 5).

Anzahl der
Personen

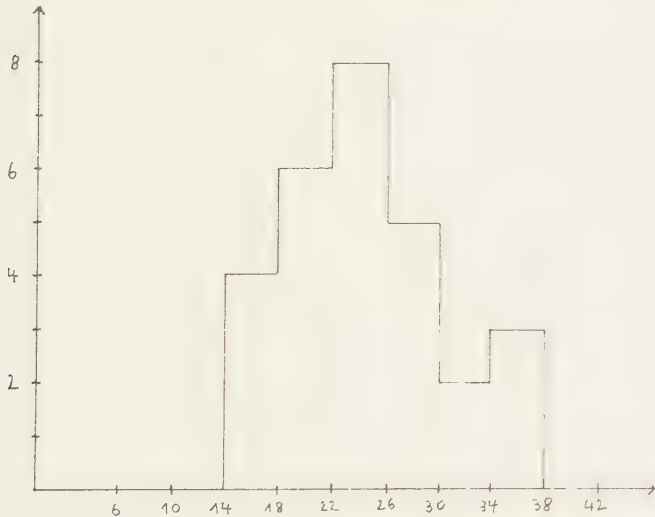


Abb. 5: Verteilung der Cholinesterase-Restaktivitäts-
werte Vergifteter mit hochthorax- oder hochabdominal-
blutsverwandten Elternteilen

Im Vergleich dazu zeigte die Verteilung der Restaktivitätswerte der mit DFP vergifteten Seren eine nicht eindeutig als eingipfelig zu erkennende Verteilung (Abbildung 6).

Anzahl der
Personen

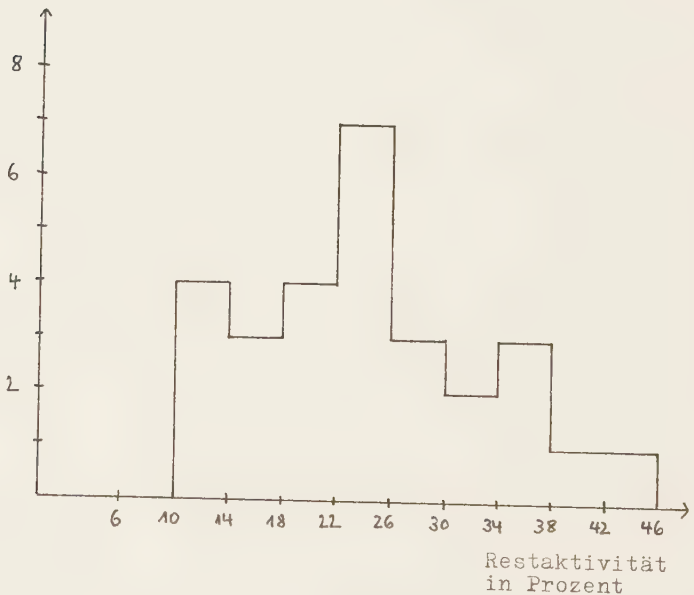


Abb. 6: Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität nach DFP-Vergiftung bei 28 nicht blutsverwandten Elternteilen

Abbildung 7 stellt den Zusammenhang zwischen den Cholinesterase-restaktivitäten der Seren aller untersuchten Personen nach Vergiftung mit Echothiopat sowie mit DFP in Form einer Punktwolke dar.

Restaktivität in Prozent
nach Vergiftung mit DFP

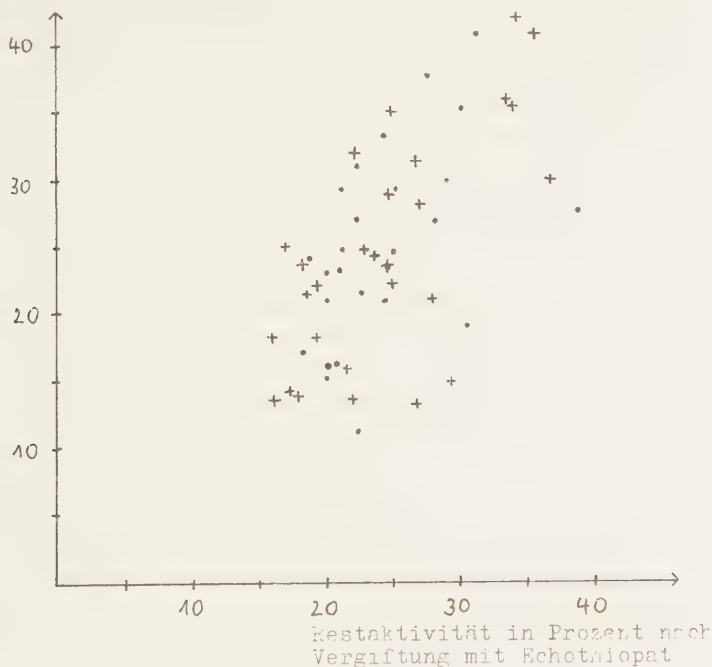


Abb. 7: Darstellung des Zusammenhangs zwischen den Restaktivitäten der mit Echothiopat und der mit DFP vergifteten Seren als Punktwolke

- + 28 nicht blutsverwandte Elternteile
- 25 Kinder

Aus den einzelnen Restaktivitätswerten nach Vergiftung mit Echothiopat und DFP errechneten wir einen Korrelationskoeffizienten von $r = + 0,67$ bei alleiniger Berücksichtigung der 28 nicht blutsverwandten Elternteile. Berechnet man den Korrelationskoeffizienten für die 25 Kinder aus den 14 Familien, so ergibt sich ein Wert von $r = + 0,53$. Nimmt man in diese Betrachtung alle 53 untersuchten Personen auf, so liegt der Korrelationskoeffizient bei $r = + 0,60$.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgte mit Hilfe der Formel (Campbell 1971):

$$r = \frac{S_{xy}}{S_{xx} \cdot S_{yy}}$$

wobei galt:
$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})$$

x_i/y_i = Restaktivitätswert einer Person in % bei Vergiftung mit Echothiopat/DFP

$\bar{x} / \bar{y}$ = Durchschnitt aller Restaktivitätswerte bei Vergiftung mit Echothiopat/DFP

Während unserer Messungen fiel auf, daß die durchschnittlichen Cholinesterase- Restaktivitätswerte bei Vergiftung des Serums mit Echothiopat bzw. DFP bei den untersuchten nichtverwandten Männern höher lagen als bei den Frauen.

So ergaben sich bei Vergiftung der Seren der 14 nichtverwandten Männer mit Echothiopat Restaktivitätswerte von 18,4 % bis 35,4 %, der durchschnittliche Wert lag bei 26,8 %. Bei den untersuchten Frauen lagen die Werte zwischen 16,0 % und 33,7 %, im Durchschnitt bei 22,0 %.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei Überprüfung der mit DFP gewonnenen Werte. Hier lagen die Restaktivitäten bei den Männern zwischen 14,8 % und 42,0 %, im Durchschnitt bei 27,5 %. Bei den Frauen ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 21,1 %, bei Einzelwerten zwischen 13,2 % und 35,2 %.

Wir prüften weiter den Zusammenhang zwischen den Cholinesterase- Restaktivitäten (angegeben in % zur Ausgangsaktivität) der mit Echothiopat bzw. DFP vergifteten Seren und den Cholinesterase-Ausgangsaktivitäten der Seren vor dieser Vergiftung in Form von Punktwolken. Diesen Zusammenhang stellten wir in Abbildung 8 und 9 dar.

Der Korrelationskoeffizient r , der den Zusammenhang zwischen den Ausgangsaktivitäten und den Cholinesterase-Restaktivitäten (in Prozent zur Ausgangsaktivität) der Seren nach Vergiftung mit Echothiopat anzeigt, lag bei $r = + 0,41$. Im Vergleich dazu betrug der entsprechende Korrelationskoeffizient bei Vergiftung der Seren mit DFP $r = + 0,57$.

Restaktivität
in Prozent

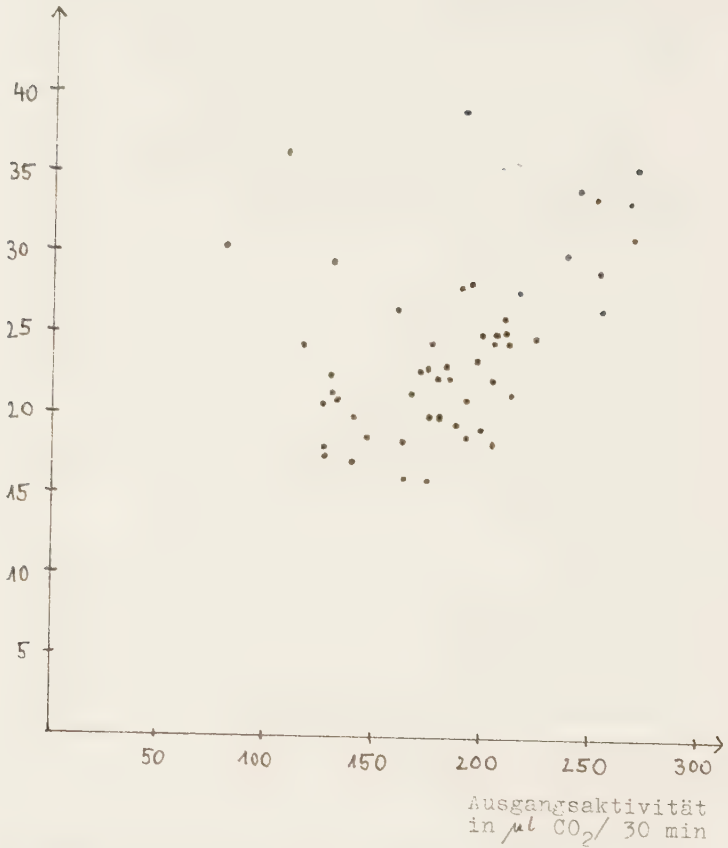


Abb. 8: Darstellung des Zusammenhangs zwischen den Restaktivitäten (in % zur Ausgangsaktivität) der mit Echothiopat vergifteten Seren und den Ausgangsaktivitäten vor der Vergiftung in Form einer Punktwolke. Berücksichtigt wurden alle 53 Personen

Restaktivität
in Prozent

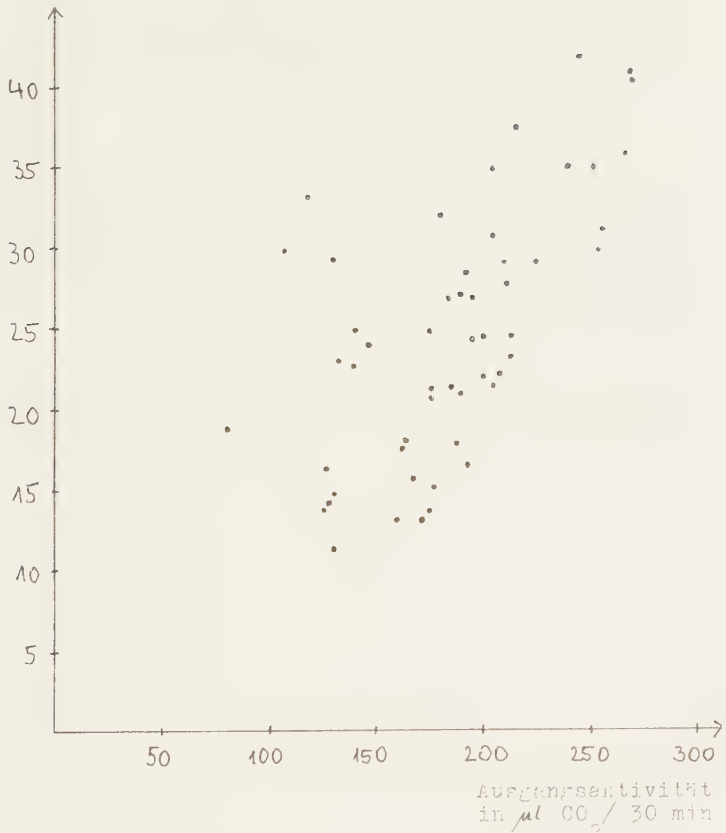


Abb. 9: Darstellung des Zusammenhangs zwischen den Restaktivitäten (in zur Ausgangsaktivität) der mit DFP vergifteten Seren und den Ausgangsaktivitäten vor der Vergiftung in Form einer Punktwolke. Berücksichtigt wurden alle 42 untersuchten Personen

Abbildung 10 und 11 stellen den Zusammenhang zwischen den Cholinesterase- Restaktivitäten (in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$) der mit Echothiopat bzw. DFP vergifteten Seren und den Cholinesterase- Ausgangsaktivitäten (in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$) der Seren vor dieser Vergiftung in Form von Punktwolken dar.

Der Korrelationskoeffizient r , der den Zusammenhang zwischen den Ausgangsaktivitäten und den Cholinesterase- Restaktivitäten (in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$) der Seren nach Vergiftung mit Echothiopat anzeigt, lag bei $r = + 0,83$.

Der entsprechende Korrelationskoeffizient bei Vergiftung der Seren mit DFP lag bei $r = + 0,84$.

Restaktivität

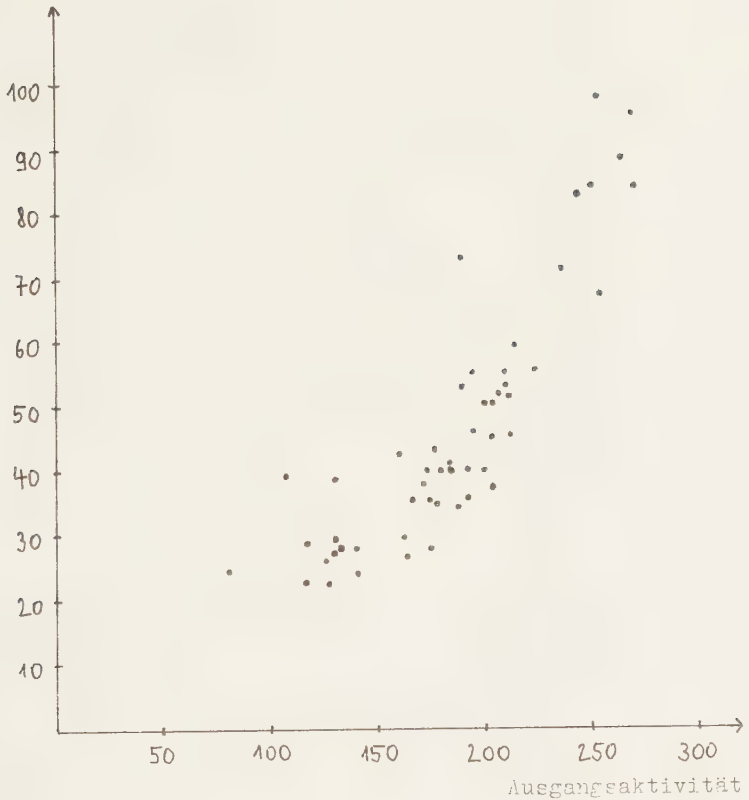


Abb. 10: Darstellung des Zusammenhangs zwischen den Restaktivitäten (in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$) der mit Echothiopat vergifteten Seren und den Ausgangsaktivitäten vor der Vergiftung in Form einer Punktwolke. Berücksichtigt wurden alle 53 Personen

Restaktivität

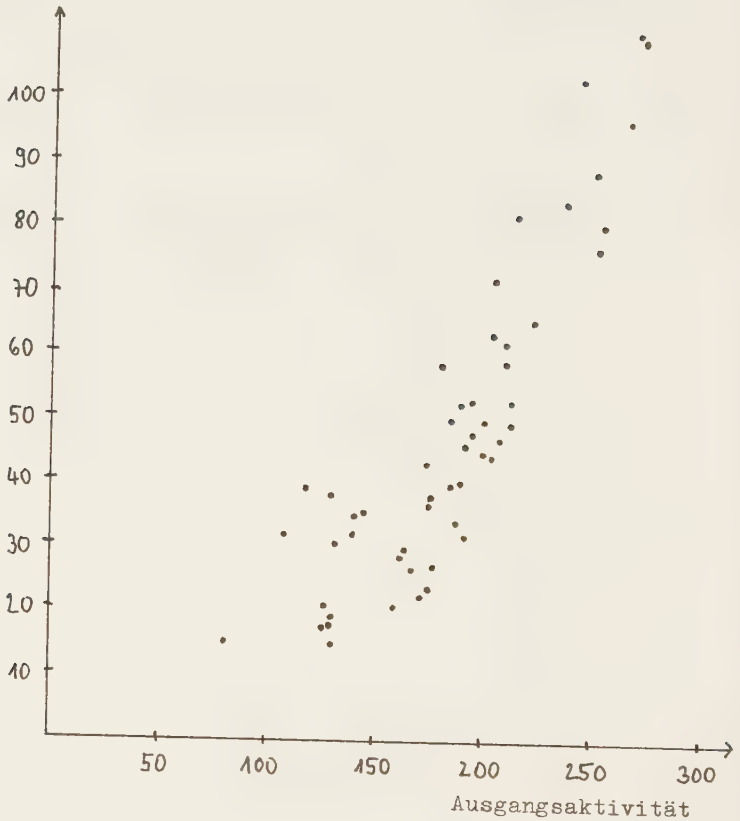


Abb. 11: Darstellung des Zusammenhangs zwischen den Restaktivitäten (in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$) der mit DFP vergifteten Seren und den Ausgangsaktivitäten vor der Vergiftung in Form einer Punktwolke. Berücksichtigt wurden alle 53 untersuchten Personen

Im folgenden Abschnitt soll auf optische Weise die Erbllichkeit der Restaktivitätswerte nach Vergiftung der Seren mit DFP und Echothiopat mit Hilfe von Stammbäumen untersucht werden. In diesen Stammbäumen sollen in Form von schwarz eingezeichneten Sektoren die jeweiligen Restaktivitäten der Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit Echothiopat bzw. DFP dargestellt werden.

Abb. 12: Darstellung der Stammbäume der untersuchten Familien mit Berücksichtigung der einzelnen Restaktivitätswerte (Relativwerte zur Ausgangsaktivität) der Cholinesterase nach Vergiftung der Seren mit DFP bzw. Echothiopat

Echothiopat

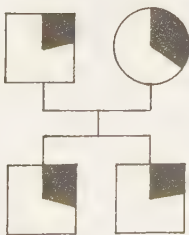
DFP



FAMILIE 1

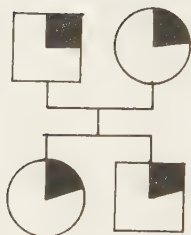


FAMILIE 2

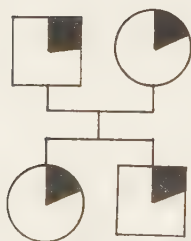
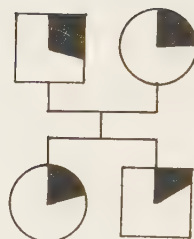


Echothiopat

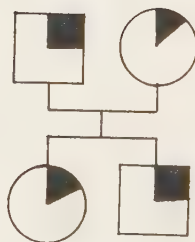
DFP



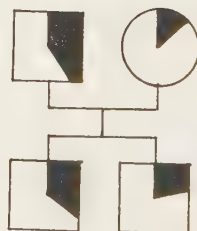
FAMILIE 3



FAMILIE 4

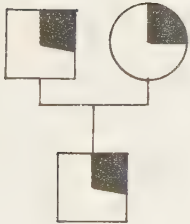


FAMILIE 5



Echothiopat

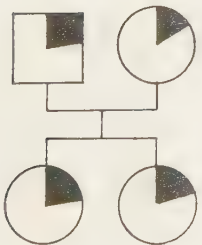
DFP



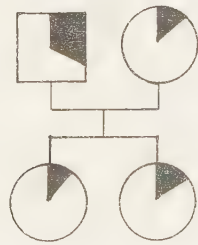
FAMILIE 6



FAMILIE 7

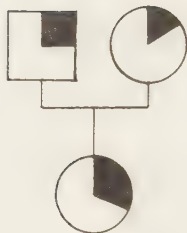


FAMILIE 8

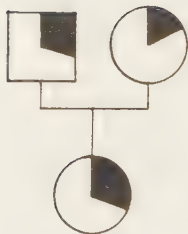
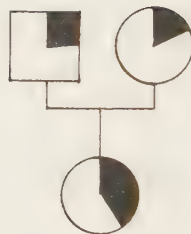


Echothiopat

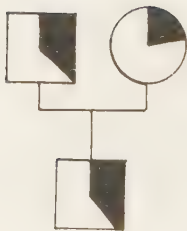
DFP



FAMILIE 9



FAMILIE 10

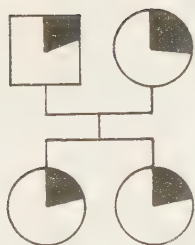


FAMILIE 11

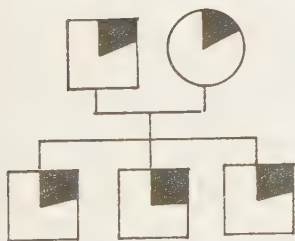
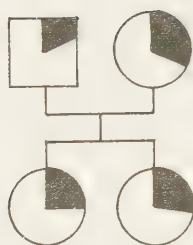


Echothiopat

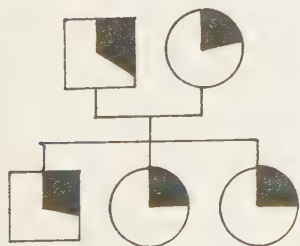
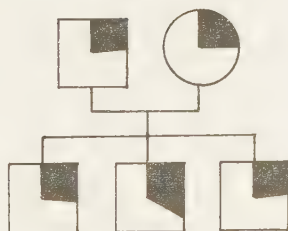
DFP



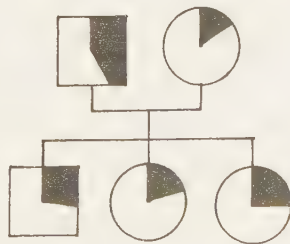
FAMILIE 12



FAMILIE 13



FAMILIE 14



Betrachtet man die einzelnen Familien getrennt, so zeigt sich in manchen Fällen eine gewisse Ähnlichkeit der Restaktivitätswerte der Kinder mit den entsprechenden Werten der Eltern.

In zahlreichen Familien (bei Vergiftung der Seren mit Echothiopat: Familie Nr. 4, 6, 7, 8, 12, 14; bei Vergiftung der Seren mit DFP: Familie Nr. 2, 4, 5, 11, 12, 14) besaßen die Kinder Cholinesterase-Restaktivitätswerte, die zwischen den Werten ihrer Eltern lagen.

Hatten beide Elternteile Restaktivitätswerte, die unter dem Durchschnitt lagen, so wiesen die Kinder (Echothiopat: Familie Nr. 13; DFP: Familie Nr. 10) ebenfalls niedrige Werte auf.

Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse der Kinder der Familien Nr. 9 (Echothiopat) und Nr. 3, 6, 9 (DFP) keinerlei Abhängigkeit von den Restaktivitätswerten ihrer Eltern.

Zusammenfassung läßt sich auf Grund der zum Teil widersprüchlichen Werte der Cholinesterase - Restaktivität nach Vergiftung mit DFP bzw. Echothiopat in den übrigen Familien kein eindeutiges Urteil über eine mögliche Vererbung abgeben. In vielen Fällen scheinen die Cholinesterase- Restaktivitätswerte der Kinder in einer klaren Abhängigkeit zu den Werten ihrer Eltern zu stehen, in einigen Fällen zeigt sich jedoch keinerlei Zusammenhang.

D DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

In unseren Untersuchungen konnten wir bei der Hemmung der Cholinesterase durch Echothiopat und Diisopropylfluorophosphat keine, dem Abbau von Paraoxon ähnliche dreigipfelige Verteilung im Histogramm erkennen. Daraus kann man zunächst den Schluß ziehen, daß für eine Hydrolyse der beiden untersuchten Verbindungen im menschlichen Serum nicht die Serum- Paraoxonase verantwortlich ist.

Das Histogramm der Cholinesteraserestaktivitäten der mit Echothiopat vergifteten Seren zeigt bei alleiniger Berücksichtigung der 28 Eltern eine nahezu eingipfelige Verteilung. Auch beim DFP - Abbau kann man eine unimodale Verteilung der Meßwerte erkennen. Die kleine Häufung der Werte beim Abbau des Echothiopat im Bereich der hohen Restaktivitätswerte und die große Streuung der Cholinesteraserestaktivitätswerte bei Vergiftung der Seren mit DFP dürfte in unseren Untersuchungen zufällig und durch die geringe Probandenzahl bedingt sein.

Der Vergleich der Restaktivitätswerte der Serumcholinesterasen nach Vergiftung mit Echothiopat und DFP zeigt bei einer Aufzeichnung der Ergebnisse in einer Punktwolke einen gewissen Zusammenhang. Dies bestätigt sich bei der Berechnung der Korrelationskoeffizienten, die bei $r = + 0,53$ und $+ 0,67$ liegen und aufgrund deren wir von einer mittleren Korrelation beim Abbau von DFP und Echothiopat im menschlichen Serum sprechen können.

Aus diesen Ergebnissen darf aber keinesweg geschlossen werden, daß überhaupt ein Abbau von DFP und Echothiopat im Serum durch ein Enzym erfolgt.

Während unserer Versuche zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Cholinesteraseausgangsaktivität und der Restaktivität nach Vergiftung der Seren durch DFP bzw. Echothiopat.

Bei der Vergiftung des Serums mit DFP ergab sich ein Korrelationskoeffizient für die Ausgangsaktivität und die Cholinesterase-Restaktivität (angegeben in Prozent zur Ausgangsaktivität) von $r = + 0,57$. Der entsprechende Wert bei Vergiftung des Serums mit Echothiopat lag bei $r = + 0,41$.

Wurden nicht die relativen, sondern die absoluten Restaktivitätswerte der Serum- Cholinesterase (in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$) nach Vergiftung mit Echothiopat bzw. DFP herangezogen, so lagen die Korrelationskoeffizienten sogar bei $r = + 0,83$ bzw. $r = + 0,84$.

Es ist nun in weiteren Arbeiten zu klären, ob sich in größeren Kollektiven diese Korrelation bestätigt und wenn ja, in wie weit ein gewisser "Titrationseffekt" für diese Ergebnisse verantwortlich sein könnte, derart, daß die zugegebene Alkylphosphatmenge jeweils einen äquimolaren Anteil der vorhandenen Serum-Cholinesterase vergiftet, bzw. auch an andere Serum-eiweiße gebunden wird.

Beim Abbau des Paraoxon im menschlichen Serum konnten aufgrund der trimodalen Verteilung der Cholinesterase-

restaktivitätswerte mit vergleichenden Untersuchungen der Paraoxonaseaktivität mit dem photometrischen Verfahren nach Krisch (1968) drei verschiedene, voneinander unabhängige Aktivitätsgruppen der Serum-paraoxonase sicher festgestellt werden.

Familienuntersuchungen legten den Gedanken nahe, daß ein 2- Allel - Modell bei dem intermediären Erbgang für die Paraoxonase verantwortlich ist.

Aus unseren Untersuchungen ergaben sich für die Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung der Seren mit DFP bzw. Echothiopat jeweils unimodale Verteilungen, womit eine Einteilung in Gruppen verschiedener Cholinesterase-Restaktivitätswerte mehr oder weniger willkürlich erfolgen müßte.

Ein einfaches Vererbungsmodell (z. B. dominant - rezessiv, intermediär) dürfte in unserem Fall sowohl für eine DFPase wie auch für eine Echothiopatase nicht vorliegen. Wenn überhaupt, so erscheint ein polygenetisches oder sogar multifaktorielles Erbmodell beim Abbau von DFP und Echothiopat in Frage zu kommen.

Eine hohe Korrelation zwischen der Ausgangsaktivität und der Restaktivität der Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit DFP bzw. Echothiopat spricht eher gegen eine wesentliche Beteiligung einer DFPase bzw. Echothiopatase im Serum und einen erblichen Einfluß. Aufgrund unserer Korrelationen kommt viel eher ein "Titrationsmodell" in Frage.

Diese Ergebnisse könnten weiter abgesichert werden, wenn es gelänge, eine eventuelle Spaltung von Echothiopat bzw. DFP im menschlichen Serum mit Hilfe eines photometrischen Verfahrens zu überprüfen, wobei abgespaltene Teile quantitativ erfasst werden sollten, ähnlich wie dies Krisch für die Abspaltung des Paranitrophenol von Paraoxon gezeigt hat.

E LITERATURVERZEICHNIS

Aldridge, W. N.:

Serum esterases: 1. Two types of esterase (a and b) hydrolysing p-nitrophenyl-acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.
Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

Aldridge, W. N.:

Serum esterases: 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (E 600) and its identity with the A - esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

Ammon, R.:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.
Pflüg. Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)

Augustinsson, K. B. und Heimbürger, G.:

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)

Augustinsson, K. B. und Heimbürger, G.:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
I. Occurrence of enzymes hydrolysing dimethylamido-ethoxyphosphoryl cyanide (Tabun).
Acta Chem. Scand. 8, 753 (1954 b)

Axelsson, U. and Holmberg:

The frequency of cataract after miotic therapy.
Acta Ophthal. (Kobenhavn) 44, 421 (1966)

Becker, B., Pyle G. and Drews, R.:

The tonographic effect of Echothiopate (Phospholine)
Jodide.

Amer. J. Ophthal. 47, 635 (1959)

Campbell, R. C.:

Statistische Methoden für Biologie und Medizin.

G. Thieme Verlag, Stuttgart (1971)

Cohen, J. A. and Warringa, M. G. P. J.:

The fate of P^{32} labelled diisopropylfluorophosphonate
in the human body and its use as a labelling agent
in the study of turnover of bloodplasma and red cells.

J. Clin. Invest. 32, 459 (1954)

Comroe, J. H., Todd, J. and Koelle, G. B.:

The pharmacology of diisopropylfluorophosphate (DFP) in man.

J. Pharmacol. Exper. Therap. 87, 281 (1946)

De Roethth, A.:

Lens opacities in glaucoma patients on phospholine
iodide therapy.

Amer. J. Ophthal. 62, 619 (Okt. 1966)

De Roethth, A.:

Blood cholinesterase activity of glaucoma patients
treated with phospholine iodide.

Amer. J. Ophthal. 62, 834 (Nov. 1966)

Ell, W.:

Diisopropylfluorophosphat und die DFP-ase (E.C.3.8.2.1).

Dissertation Erlangen Nov. 1979

Ellis, P. P. and Esterdahl:

Echothiopate iodide therapy in children. Effect upon blood cholinesterase levels.

Arch. Ophthal. (Chicago) 77, 598 (1967)

Friedberg, K. D. und Sakai, F.:

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) im Blut- und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methyljodid, PAM).

Deutsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Lindorf, H. und Kabast, U.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600.

Arch. Toxil. 25, 223 (1973)

Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Lindorf, H., Pétényi, M.,

Flügel, M., Fischer, T., Hiller, T.:

Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase.

Humangenetik 17, 331 (1969)

Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Hommel, G., Dumbach, J.:

On the Genetics of the Human Serum Paraoxonase (E.C.3.1.1.2).

Hum. Genet. 50, 313 (1979)

Greiner, G.:

Methode zur Bestimmung der Restaktivität der Serum Cholinesterase (E.C.3.1.1.8) im menschlichen Serum nach Vergiftung mit DFP.

Erlangen, Dissertation in Vorbereitung

Grob, D.:

The administration of diisopropylfluorophosphate (DFP) to man. I. Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase; general systemic effects; use in study of hepatic function and erythropoiesis; and some properties of plasma cholinesterase.

Bull. John Hopkins Hosp. 81, 217 (1947 a)

Grob, D.:

The administration of diisopropylfluorophosphate (DFP) to man. III. Effect on the central nervous system with special reference to the electrical activity of the brain.

Bull. John Hopkins Hosp. 81, 257 (1947 b)

Haddad, H. M. and Leopold:

Rabbit lens uptake of tritium-labelled phospholine iodide.

Amer. J. Ophthal. 68, 123 (1969)

Häusler, E.:

Dissertation in Vorbereitung, Erlangen

Hansen, D., Schaum, E. and Wassermann, O.:

Serum level and excretion of diisopropylfluorophosphate (DFP) in cats.

Biochem. Pharmacol. 17, 1159 (1968)

Hansen, D., Schaum, E. und Wassermann, O.:

Organverteilung und Stoffwechsel von Diisopropylfluorophosphat (DFP) beim Meerschweinchen.

Arch. Toxikol. 23, 73 (1968)

Hiscox, P. E. A. and Mc Culloch, C.:

The effect of echothiopate iodide on systemic cholinesterase.

Canad. J. Ophthal. 1, 274 (Okt. 1966)

Hoffmann, K.:

Phospholiniodid in der Behandlung des Glaukoms.

Klin. Monatsbl. Augenheilkunde 158, 413 (1971)

Hoskin, F. C. G.:

Diisopropylphosphorofluoridate and Tabun:

Enzymatic hydrolysis and nerve function.

Science 174, 1243 (1971)

Hussain, A.:

Kinetics and mechanism of degradation of echothiopate iodide in aqueous solution.

Journal of Pharmaceutical Sciences 57, 411 (1968)

Koelle, G. B. and Gilman, A.:

The chronic toxicity of diisopropylfluorophosphate (DFP) in dogs, monkeys and rats.

J. Pharmacol. Exper. Therap. 87, 435 (1946)

Koelle, G. B. and Steiner, E. C.:

The cerebral distributions of a tertiary and a quaternary anticholinesterase agent following intravenous and intraventricular injection.

J. Pharmacol. Exper. Ther. 118, 420 (1956)

Krisch, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600) durch menschliches Serum.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6, 41 (1968)

Latki, O. und Erdmann, W. D.:

Hemmung und Reaktivierung von Cholinesterase nach Vergiftung mit Paraoxon und DFP in vitro.

Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. 240, 514 (1961)

Leopold, J. H. and Comroe, J. H. jr.:

Use of diisopropylfluorophosphate (DFP) in treatment of glaucoma.

Arch. Ophth. 36, 1 (1946 a)

Leopold, J. H. and Comroe, J. H. jr.:

Effect of diisopropylfluorophosphate (DFP) in the normal eye.

Arch. Ophth. 36, 17 (1946 b)

Leopold, J. H., Gold, P. and Gold, D.:

Use of a thiophospholine quarternary compound in treatment of glaucoma.

Arch. Ophth. 58, 363 (1957)

Marynen-de Preter, L.:

Ophthalmological use of organophosphates and their effects on the enzyme system.

Acta Anaesthesiol. Belg. 23, 122 (1972)

Mazur, A. and Bodansky, O.:

The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of cholinesterase activity by diisopropylfluorophosphate.

J. Biol. Chem. 163, 261 (1946)

Mounter, L. A.:

Some studies of enzymatic effects of rabbit serum.
J. Biol. Chem. 209, 813 (1954)

Neurath, A. R.:

A component splitting diisopropylfluorophosphate in
Sendai and Newcastle disease virus preparations;
its possible identity with haemolysin.
Acta virol. 9, 25 (1965)

Oosterbaan R., Kunst P., v. Rotterdam, J., Cohen, J. A.:

The reaction of chymotrypsin and diisopropylphosphorofluoridate.
II. The structure of two DP-substituted peptides from
chymotrypsin - DP.
Biochem. Biophys. Acta 27, 556 (1958)

Schrader, G.:

Chlorthion: Ein neues wenig giftiges Insektizid aus
der Reihe der Thiophosphorsäureester.
Angewandte Chem. 66, 265 (1954)

Süllmann, E.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebs-
stoffwechsels.
In: Handbuch des Physiologisch- und Pathologisch-
Chemischen Analyse.
Herausgegeben von K. Lang und E. Lehnartz Bd. VI A,
Teil A, Berlin-Heidelberg-New York: Springer (1964)

Verbeke, R.:

Sur la pharmacologie du diisopropylfluorophosphate (DFP).
Arch. int. pharmacodyn. 75, 415 (1948)

Verbeke, R.:

Nouvelles contributions à la pharmacologie du
diisopropylfluorophosphonate (DFP).
Arch. int. pharmacodyn. 79, 1 (1949)

Wahlby, S. and Engström, L.:

Reaction of an extracellular proteolytic enzyme from
a strain of arthrobacter with diisopropylphospho-
fluoridate (DFP).
Acta Chem. Scand. 20, 1993 (1966)

Wahlby, S.:

The primary structure at the DFP-reacting site of a
proteolytic enzyme from a strain of arthrobacter.
Biochem. Biophys. Acta 151, 409 (1968)

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling sage ich meinen aufrichtigen Dank für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die Übernahme des Korreferates.

Besonders herzlich danke ich Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher- v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, für ihre große Hilfsbereitschaft und ihr zu jeder Zeit freundliches Entgegenkommen.

Lebenslauf

Personalien : Andreas Ahnert
geb. 23. 4. 1955 in Regensburg

Familienstand : ledig

Staatsangehörigkeit : Deutsch

Eltern : Günther Ahnert, Malermeister
Grete Ahnert, geb. Wagner

Ausbildung : Volksschule: 1961 - 1965
in Regensburg

Gymnasium: 1965 - 1974
Nat.-Math. Gymnasium
in Regensburg

Universität: 1974 - 1975
Mathematik und Physik
in Regensburg
1975 - 1981
Medizin in Erlangen

